

Prevención del daño renal inducido por isquemia caliente mediante el uso de un líquido de perfusión que contiene manitol

J. Torras^{*}, J. R. Bordalba^{***}, D. Serón^{**}, M. Carrera^{****}, A. M. Castelao^{**}, R. Poveda^{**}, J. Alsina^{**} y J. Griño^{**}

Unitat de Recerca Experimental^{*} y Servicios de Nefrología^{**}, Urología^{***} y Anatomía Patológica^{****}. Hospital de Bellvitge. Barcelona.

RESUMEN

La isquemia caliente renal (ICR) durante el trasplante es responsable de una parte importante del daño isquémico producido en el aloinjerto. Realizamos un estudio con un modelo experimental de ICR y nefrectomía contralateral para evaluar la capacidad de preservación renal del M-400, un líquido hipertónico que contiene manitol, (manitol 4,19 g/dl, 400 mOsm/kg) y cuya composición electrolítica remeda la del medio intracelular.

Estudiamos 18 ratas Wistar hembra de un peso entre 200 y 300 gramos. Después de la laparotomía y disección del riñón izquierdo, los animales fueron asignados aleatoriamente a tres grupos: grupo 1: sesenta minutos de ICR (n = 6); grupo 2: perfusión con Eurocollins seguida de sesenta minutos de ICR (n = 6); grupo 3: perfusión con M-400 seguida de sesenta minutos de ICR (n = 6). Seguidamente se hizo nefrectomía derecha. Se determinó creatinina sérica basal y también los días uno, dos, tres y seis poscirugía. El sexto día se practicó estudio histológico renal.

La creatinina del primero y segundo día fue más elevada en los grupos 1 y 2 que en el grupo 3 (primer día: grupo 1: $271,8 \pm 29,9$; grupo 2: $245,0 \pm 37,6$; grupo 3: $141,8 \pm 16,3$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,01$) (segundo día: grupo 1: $229,7 \pm 101,4$; grupo 2: $331,7 \pm 174,8$; grupo 3: $76,3 \pm 9,9$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$). El análisis semicuantitativo de las lesiones histológicas de nefritis tubulointersticial isquémica y, en especial, la pérdida del ribete en cepillo y la dilatación tubular mostró mayor afectación en los grupos 1 y 2 que en el grupo 3, siendo el área intercorticomedular la más afectada. Las lesiones del grupo 3 fueron escasas y focales. La creatinina del sexto día era menor en el grupo 3 que en los otros dos grupos, aunque no de forma significativa.

Concluimos que, en nuestro modelo experimental, el M-400 es un líquido de preservación más efectivo que el Eurocollins en la preservación renal durante la isquemia caliente. Se discuten los posibles mecanismos de acción.

Palabras clave: **Isquemia caliente. Solución de preservación. Fracaso renal agudo.**

Recibido: 7-XI-90.
En versión definitiva: 4-III-91.
Aceptado: 4-III-91.

Correspondencia: Dr. J. M. Griño.
Servicio de Nefrología.
Hospital de Bellvitge.
Feixa Llarga, s/n.
08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.

FLUSH SOLUTION WITH MANITOL IN THE PREVENTION OF THE RENAL DAMAGE DUE TO WARM ISCHAEMIA

SUMMARY

Abstract. Renal warm ischaemia (RWI) during kidney reperfusion in transplantation produces most of the ischaemic allograft damage. The ability of M-400, a hypertonic flush solution with mannitol and an electrolytic composition like intracellular space, to prevent organ damage due to RWI was studied (mannitol 4.19 g/dL, 400 mOsm/kg).

Eighteen female adult Wistar rats weighting 200 to 300 grams were studied. After laparotomy and left renal dissection, rats were randomly allocated to three groups: Group 1: 60 minutes of RWI (n = 6); Group 2: Eurocollins flushing followed by 60 minutes of RWI (n = 6); Group 3: M-400 flushing followed by 60 minutes of RWI (n = 6). Nephrectomy of right kidney was performed. Prior to surgery and on days 1, 2, 3 and 6 post surgery serum creatinine levels were determined. On the sixth day post surgery, renal histology was done.

First and second day creatinine was higher in groups 1 and 2 than in group 3 (1st day: Gr. 1: 271.8 ± 29.9; Gr. 2: 245.0 ± 37.6; Gr. 3: 141.8 ± 16.3 µmol/l, p < 0.01) (2nd day: Gr. 1: 229.7 ± 101.4; Gr. 2: 331.7 ± 174.8; Gr. 3: 76.3 ± 9.9 µmol/l, p < 0.05). Semiquantitative analysis of tubulo interstitial ischaemic nephritis lesions and, specially tubular dilation and brush border loss, showed more affectation in groups 1 and 2 than in group 3. The intercorticomedular area was the most affected. In group 3, renal damage was scanty and focal. Serum creatinine on sixth day was lower in group 3 than in the other groups, but not significantly.

Thus, in our experimental model, M-400 has showed as a flush solution more effective than Eurocollins in renal preservation during warm ischaemia. The probable mechanisms of action are discussed.

Key words: Warm ischaemia. Flush solution. Acute renal failure.

Introducción

La necrosis tubular aguda en el postrasplante renal influye negativamente en la supervivencia del injerto¹⁻³. Una parte importante del daño isquémico renal se produce durante y después de la revascularización del injerto^{4,5}. Esta lesión isquémica está mediada, al menos en parte, por la generación de radicales libres de oxígeno⁵⁻⁷ en el momento de la reperfusión a través de la activación de la xantinoxidasa⁸.

La solución de preservación renal más ampliamente utilizada es una solución de Collins modificada, denominada Eurocollins. Sin embargo, en estudios clínicos amplios se ha comprobado una incidencia de necrosis tubular de alrededor del 30 % con el uso de esta solución⁹. Se ha sugerido que ello sea debido a que la solución de Eurocollins pueda no ser efectiva o incluso perjudicial durante la isquemia caliente¹⁰. Por ello se están realizando estudios clínicos^{11,12} y experimentales^{13,14} usando otros líquidos de perfusión.

El manitol tiene una estructura similar a la glucosa y a su alcohol, el sorbitol. El manitol es metabólicamente iner-

te y, después de su infusión endovenosa, permanece ampliamente en el espacio extracelular y se excreta inalterado en la orina¹⁵. Debido a su acción osmótica se ha usado como agente diurético¹⁶. Asimismo, el manitol actúa como «scavenger» de radicales hidróxilo^{5,6}. Se ha comprobado en diversos modelos animales de fracaso renal agudo que el manitol es protector renal^{17,18}. Por ello ha sido utilizado con éxito administrado endovenoso previo a la revascularización renal^{19,20} o en soluciones de preservación¹¹ en clínica humana, consiguiendo una disminución significativa de la tasa de insuficiencia renal postrasplante.

Basándonos en estas premisas, en el presente trabajo estudiamos en un modelo animal la capacidad de disminuir el daño tisular renal producido por la isquemia caliente mediante la utilización de una solución de preservación que contenía manitol.

Material y métodos

Para el estudio se usaron 18 ratas Wistar hembra, de un peso medio entre 200 y 300 gramos.

Soluciones de preservación

Utilizamos dos soluciones de preservación: la solución de Eurocollins y una solución que contenía manitol, denominada M-400 y desarrollada por J. M. Griño (tabla I). Esta solución se diferencia de la de Eurocollins en que se ha sustituido la dextrosa por manitol.

Tabla I. Composición de las soluciones utilizadas (g/100 ml). M-400: solución hipertónica que contiene manitol y desarrollada por J. M. Griño

	Eurocollins	M-400
Dextrosa	2,5	—
Manitol	—	4,19
PO ₄ KH ₂	0,205	0,205
PO ₄ K ₂ H	0,97	0,97
CO ₃ HNa	0,084	0,084
ClK	0,112	0,112
Osmolalidad (mOsm/kg)	300	400
pH	7,1	7,4

Técnica quirúrgica

Tras la inducción anestésica mediante inhalación de éter, se practicó una laparotomía media, rechazando el paquete intestinal para exponer el riñón izquierdo con sus vasos y la aorta en la vecindad del pedículo renal. La aorta fue clampada con un pequeño clamp por debajo de las arterias renales y canulada mediante una aguja 23 «gauge», unida a un equipo de infusión que contenía la solución de preservación. Se colocó entonces un clamp en aorta por encima de la arteria renal izquierda y se retiró el inferior. Se inició entonces la perfusión de la solución a temperatura ambiente a través de la aorta canulada, dirigiéndola con ello hacia el riñón izquierdo. Una vez el riñón tomó una coloración blanquecina (2 cc de solución), se colocó un clamp en el pedículo renal izquierdo y se cesó la perfusión. Seguidamente se retiró la cánula de la aorta y se cerró el orificio de punción mediante electrocoagulación, retirando posteriormente el clamp aórtico. Después de un tiempo total de isquemia del riñón izquierdo de una hora, se retiró el clamp del pedículo renal, permitiendo la reperfusión del órgano. Seguidamente se procedió a nefrectomía derecha y cierre de la laparotomía. Las ratas fueron colocadas en jaulas en condiciones y temperatura confortables, con libre acceso a comida y agua.

Se establecieron tres grupos de seis animales cada uno según la perfusión utilizada:

Grupo 1: Isquemia caliente renal de una hora sin perfusión previa.

Grupo 2: Perfusión con solución de Eurocollins, y posteriormente isquemia caliente renal de una hora.

Grupo 3: Perfusión con solución M-400, y posteriormente isquemia caliente renal de una hora.

Se evaluó peso y creatinina previo a la cirugía y también los días uno, dos, tres y seis poscirugía. La sangre se extrajo de los vasos retrooculares usando una micropipeta. La creatinina se cuantificó mediante el sistema de química seca Kodak Ektachem.

Histología

El sexto día poscirugía se sacrificó el animal. El día del sacrificio se procedió a la anestesia mediante inhalación de éter. Se realizó apertura de la cavidad peritoneal y examen del riñón. Seguidamente se abrió la cavidad torácica y a corazón batiente se puncionó el ventrículo izquierdo mediante un Abbocath de 20 «gauge» y se procedió a perfundir suero fisiológico. Se seccionó la aurícula derecha para drenaje y se dejó al animal exangüe. A continuación, se perfundieron 200 cc de paraformaldehído al 4 % con la finalidad de fijar todo el animal, y en especial el riñón, para la microscopía óptica.

El riñón fue fijado en formol y embebido en parafina. Se cortaron secciones transversales de 2-3 micras de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómico de Mason, azul de toluidina y plata metenamina. Se valoraron de forma semicuantitativa, de 0 a 3 cruces, los parámetros siguientes: dilatación tubular, células desprendidas, vacuolización tubular, necrosis de las células tubulares, pérdida o integridad del ribete en cepillo tubular evaluado mediante la desaparición de la positividad para la tinción de PAS en el borde de los túbulos, edema intersticial, fibrosis intersticial e infiltrado intersticial focal. Asimismo, se valoró la localización medular, intercortico-medular o cortical de dichas lesiones. Las muestras fueron procesadas por dos observadores (MCP y DSM) con amplia experiencia en patología renal y sin conocimiento previo de las muestras que valoraban.

Análisis de resultados

La función renal postisquemia, evaluada por la creatinina sérica, y los parámetros histológicos se compararon mediante la prueba no paramétrica para datos independientes de Kruskal-Wallis. Las correlaciones anatómicas se realizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados

Todos los animales sobrevivieron hasta el día del sacrificio. El peso y la creatinina precirugía fueron similares en los tres grupos ($p = NS$). La figura 1 muestra el efecto de los tres modelos experimentales sobre la función renal medida por la creatinina sérica. Las ratas de los grupos 1 y 2 mostraron una insuficiencia renal severa en el primer día (grupo 1, $271,8 \pm 29,9$; grupo 2, $245,0 \pm 37,6 \mu\text{mol/l}$) y segundo día (grupo 1, $229,7 \pm 101,4$; grupo 2, $331,7 \pm 174,8 \mu\text{mol/l}$) y con niveles de creatinina simila-

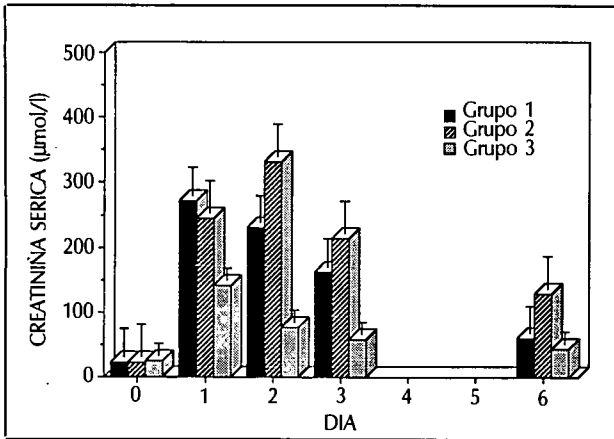


Fig. 1.—Perfil de la media de creatinina sérica durante todo el seguimiento en los tres grupos estudiados. Existe una diferencia significativa entre los tres grupos los días primero y segundo ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente).

res ($p = NS$). Por el contrario, las ratas del grupo 3 mostraron un nivel medio de creatinina significativamente menor que los otros dos grupos (primer día, $141,8 \pm 16,3$; segundo día, $76,3 \pm 9,9 \mu\text{mol/l}$) ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). Asimismo, los niveles de creatinina en el grupo 3 fueron más homogéneos, al contrario que los otros grupos en que hubo una mayor dispersión. La creatinina en el sexto día fue más elevada en el grupo 2, aunque no de una manera significativa (grupo 1, $59,7 \pm 7,3$; grupo 2, $128,8 \pm 79,8$; grupo 3, $43,2 \pm 3,5 \mu\text{mol/l}$).

El estudio histológico mostró que las lesiones más severas predominaban a nivel de los túbulos del área intercorticomedular, observándose principalmente dilatación de la luz tubular con atrofia del epitelio, pérdida del ribete en cepillo de los túbulos, presencia de células

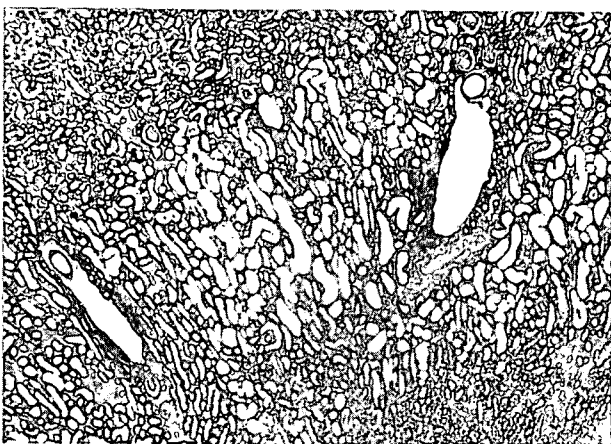


Fig. 2.—Marcada dilatación de las luces tubulares a nivel de la zona medular externa (en el centro de la fotografía): Rata del grupo 2 (HE 25 x).

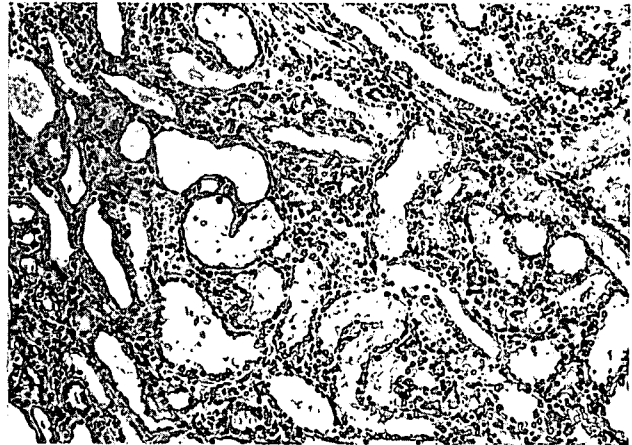


Fig. 3.—Medular externa: aplanamiento del epitelio de los túbulos con presencia de detritus celulares en su luz. Discreto infiltrado intersticial de células redondas (HE 40 x).

desprendidas en la luz tubular y existencia de microcalcificaciones intratubulares y necrosis celular. Las lesiones tubulares afectaban primordialmente a la porción distal del túbulo contorneado proximal. A nivel de los túbulos corticales se encontró únicamente vacuolización del citoplasma celular. Sobre el intersticio se observó un grado variable de edema, fibrosis e infiltrado celular (figs. 2 y 3).

El daño más pronunciado fue en los riñones de los grupos 1 y 2. Las lesiones morfológicas en los riñones del grupo 3 fueron escasas o muy focales.

La tabla II muestra el análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos evaluados en los tres grupos experimentales. En el grupo 3 (perfusión con M-400) ninguna rata presentó alteración de los parámetros morfológicos en el grado más alto (+++). Sólo se observó desprendimiento celular, infiltrado intersticial y vacuolización en grado ++ en tres ratas de este grupo. Los ratas restantes no presentaron alteraciones o las presentaron en grado +. Por el contrario, en los otros dos grupos la mayoría de las lesiones eran en grado ++ o +++. El análisis estadístico mostró una diferencia significativamente menor del grupo 3 en comparación con los otros dos grupos en cuanto a dilatación tubular, pérdida del ribete en cepillo y del infiltrado intersticial focal. La necrosis celular, el número de células desprendidas y el edema intersticial fue más severo en el grupo 2 que en los otros dos grupos. La vacuolización tubular fue similar en los tres grupos. El grado de fibrosis intersticial fue mínimo en los tres grupos.

Para conocer la relación entre el grado de insuficiencia renal y la afectación histológica se evaluó, con independencia del grupo experimental, la correlación de la creatinina del primer día poscirugía con las diversas alteraciones morfológicas. Se constató una fuerte correlación positiva con todas ellas, salvo para la vacuolización tubular y la fibrosis intersticial (tabla III).

Tabla II. Valoración semicuantitativa de las lesiones de nefritis tubulointersticial evaluadas. Se expresan como número de animales observados en cada grado de la escala: 0 - (+) - (++) - (+++). Entre paréntesis, la media de las cruces

	Grupo 1 (n = 6)	Grupo 2 (n = 6)	Grupo 3 (n = 6)	p
Dilatación tubular	0-0-3-3 (2,5)	1-0-1-4 (2,3)	4-2-0-0 (0,3)	<0,01
Células desprendidas	0-2-3-1 (1,8)	0-2-1-3 (2,2)	2-3-1-0 (0,8)	<0,05
Vacuolización	2-1-3-0 (1,2)	1-3-1-1 (1,3)	2-3-1-0 (0,8)	NS
Necrosis celular	1-2-3-0 (1,3)	1-2-1-2 (1,7)	5-1-0-0 (0,2)	<0,05
Pérdida ribete cepillo	0-2-1-3 (2,2)	0-1-1-4 (2,5)	5-1-0-0 (0,2)	<0,005
Edema	3-2-1-0 (0,7)	2-1-2-1 (1,3)	6-0-0-0 (0)	<0,05
Fibrosis	5-1-0-0 (0,2)	3-1-2-0 (0,8)	6-0-0-0 (0)	NS
Infiltrado intersticial	0-2-1-3 (2,2)	0-1-0-5 (2,7)	4-1-1-0 (0,5)	<0,05

Tabla III. Correlación de la creatinina del primer día frente a cada uno de los ocho parámetros morfológicos evaluados, con independencia del modelo experimental utilizado

	n	r ²	p
Dilatación tubular	18	0,529	0,0006
Células desprendidas	18	0,407	0,0044
Vacuolización	18	0,027	NS
Necrosis celular	18	0,566	0,0003
Pérdida ribete cepillo	18	0,478	0,0015
Edema	18	0,549	0,0004
Fibrosis	18	0,151	NS
Infiltrado intersticial	18	0,350	0,0097

Discusión

La solución de Eurocollins ha sido la más ampliamente utilizada en la preservación con hipotermia simple de riñones para trasplante renal en clínica humana. Recientemente hemos constatado¹¹ en el trasplante renal de cadáver que sustituyendo la dextrosa por manitol en la solución de Eurocollins se obtenía un mayor efecto protector contra la necrosis tubular aguda postrasplante.

Nuestros resultados en el presente trabajo en un modelo animal de isquemia caliente confirman el mayor efecto protector de esta solución que contenía manitol.

El modelo experimental utilizado, con ratas sometidas a un tiempo de isquemia caliente de sesenta minutos y nefrectomía contralateral, ha sido ampliamente referido para probar técnicas de preservación en el trasplante renal²¹⁻²³. Jablonski y cols.²¹ apuntaron este modelo como óptimo para valorar la isquemia caliente renal, ya que existía una necrosis tubular severa, una aceptable mortalidad y un daño morfológico residual incluso a los treinta días. Con otros tipos de isquemia evaluados, los resultados no eran satisfactorios²¹. Aunque es probable que el riñón tenga alguna circulación colateral que aporte algún nutriente durante la oclusión de los grandes vasos renales, los estudios a nivel tisular de nucleótidos de adenina indican

que la isquemia producida en este modelo es completamente efectiva²⁴.

Las lesiones histológicas más severas predominaban en la zona intercorticomedular. Esta localización, y en particular en la banda interna de la zona externa de la medular, ya ha sido sugerida en algunos trabajos como de mayor riesgo de hipoxia, debido a su reducida disponibilidad de oxígeno^{21, 25, 26}. Por tanto, un compromiso en el delicado balance entre la demanda y el aporte de oxígeno a este nivel puede provocar necrosis hipóxica de las células tubulares, como se ha demostrado tanto *in vitro*²⁷ como *in vivo*²⁶. Los segmentos de nefrona que mayormente se afectan son los tramos rectos del túbulo contorneado proximal^{25, 26} y el tramo ascendente grueso del asa de Henle^{27, 28}. Además, la disminución del flujo sanguíneo reduce la disponibilidad de sustratos metabólicos esenciales para la integridad estructural y funcional en estas áreas del riñón.

En el modelo de fracaso renal aguda en la rata, las lesiones morfológicas más típicas son la pérdida de la tinción positiva del ribete en cepillo y la dilatación del túbulo, consecuencia de la obstrucción tubular por fragmentos celulares y de ribete en cepillo²⁷. En nuestro grupo de ratas sometidas a isquemia aislada encontramos estas lesiones en grado importante. En el grupo de ratas sometidas a isquemia y perfusión con Eurocollins, estas lesiones son más severas que en el anterior grupo, aunque no de forma significativa. Por el contrario, el grupo de ratas perfundidas con M-400 mostraron estas lesiones en un grado mínimo, lo cual indica que el manitol preservó al riñón de la isquemia.

El interés del presente trabajo ha sido conocer la capacidad del manitol como líquido de preservación, por lo que sólo podemos especular el mecanismo a través del cual lo ejerce. Al omitir la dextrosa se evita el estímulo para una producción indeseada de iones de hidrógeno y ácido láctico a través de su metabolismo anaerobio²⁹. Por el contrario, el manitol no es metabolizable y ejerce una acción efectiva como ion impermeante evitando el edema celular producido durante la isquemia. Además, diversas observaciones experimentales^{10, 30} sugieren que la dextrosa en el líquido de preservación es incapaz de ac-

tuar de forma efectiva como un agente osmótico impermeante a temperaturas normotérmicas, aunque sí durante la hipotermia. Esto justificaría el porqué nuestros resultados con la perfusión de Eurocollins no difieren de los obtenidos con isquemia aislada.

La principal característica del manitol es su acción diurética¹⁶. Adicionalmente, el manitol induce en los animales de experimentación un incremento de la tasa de filtración glomerular, debido a la reducción de la presión oncótica sistémica por hemodilución y aumento del flujo sanguíneo renal³¹. El manitol ejerce, además, un efecto específico sobre la vasculatura renal, observándose un patrón vasorreactivo bifásico: a dosis baja se produce vasodilatación renal, mientras que a grandes dosis se produce vasoconstricción³². Nosotros utilizamos el manitol a dosis bajas, con lo cual nos beneficiamos de este efecto. Otros autores han referido este efecto vasodilatador del manitol, pero explicado por la reducción del edema endotelial vascular³³ o mediado por prostaglandinas³⁴.

El manitol es, además, un potente «scavenger» de radicales hidroxilo^{5,6}. Existe cada vez mayor evidencia de que gran parte del daño causado después de la isquemia caliente renal es debido a los radicales libres de oxígeno generados a partir de la activación de la xantinaoxidasa⁸. El efecto beneficioso de los «scavengers» de radicales libres ya ha sido demostrado en modelos experimentales^{5,35}. Por tanto, desde el punto de vista teórico, el manitol podría ofrecer este efecto beneficioso, pero los resultados de la literatura son controvertidos, con unos estudios en los que sí se observa un beneficio⁶ y otros en los que no³⁶.

En conclusión, el presente estudio confirma que el M-400 es un líquido de preservación más efectivo que el Eurocollins en la preservación renal durante la isquemia caliente. Este efecto se asocia a una mejor función renal, medido con la creatinina sérica, y a un menor daño histológico con aquella solución. Nuestros resultados confirman, además, el valor del modelo experimental aplicado para el estudio de las soluciones de preservación.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado, en parte, por una beca de la convocatoria 1990 de la Unitat de Recerca Experimental del Hospital de Bellvitge y, en parte, con fondos de la Fundación Hospital de Bellvitge y de la beca FISS 90/383.

Agradecemos a la doctora Concepción Fiol y al personal de la Unitat de Recerca Experimental del Hospital de Bellvitge por la ayuda prestada. Asimismo, agradecemos a Ana Cabezas y a María José Zujar por su labor en el procesamiento de las muestras histológicas.

Bibliografía

1. Hel J, Sutherland DER, Fryd DS, Ascher NL, Simmons RL y Najarian JS: Acute tubular necrosis of cadaver renal allograft does not correlate with organ sharing or preservation time but portends a poorer prognosis for long term graft survival. *Transplant Proc*, XVI:270-272, 1984.
2. Opelz G, Sasaki N y Terasaki PI: Prediction of long-term kidney transplant survival rates by monitoring early graft function and clinical grades. *Transplantation*, 25:212-215, 1978.
3. Fisher J, Kirste G y Keller H: Does acute tubular necrosis influence renal transplant function negatively? *Transplant Proc*, 20:908-909, 1988.
4. McCord JM: Oxigen free radicals in post ischemic tissue injury. *New Eng J Med*, 312:159-163, 1985.
5. Koyama I, Bulkley GB, Williams GM e Im MJ: The role of oxygen free radicals in mediating the reperfusion injury of cold-preserved ischemic kidneys. *Transplantation*, 40:590-595, 1985.
6. Finn WF: Prevention of ischemic injury in renal transplantation. *Kidney Int*, 37:171-182, 1990.
7. Green CJ, Healing G, Lunec J, Fuller BJ y Simpkin S: Evidence of free radical induced damage in rabbit kidneys after simple hypothermic preservation and autotransplantation. *Transplantation*, 41:161-165, 1986.
8. Paller MS, Hoidal JR y Ferris TF: Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest*, 74:1156-1164, 1984.
9. Canafax DM, Torres A, Fryd DS, Heil JE, Strand MH, Ascher NL, Payne WD, Sutherland DER, Simmons RL y Najarian JS: The effects of delayed function of recipients of cadaveric renal allograft. *Transplantation*, 41:177-180, 1986.
10. Hoelscher M, Klaess G, Kallerhoff M y Bretschneider HJ: Is EuroCollins solution losing its protective ability above 15° C? *Transplant Proc*, XVI:166-170, 1984.
11. Griño JM, Miravittles R, Castelao AM, Sabater R, Gil-Vernet S, Franco E, Andrés E, Maestre P y Alsina J: Flush solution with mannitol in the prevention of post-transplant renal failure. *Transplant Proc*, XIX:4140-4142, 1987.
12. Lam FT, Ubhi ChS, Mayor AID, Lodge JPA y Giles GR: Clinical evaluation of PBS 140 solution for cadaveric renal preservation. *Transplantation*, 48:1067-1068, 1989.
13. Ferwana OS, Pirie SC y Potts DJ: Effects of phosphate buffered sucrose solution upon the initial phase of ischemic acute renal failure in the rat. *Clin Sci*, 77:77-84, 1989.
14. Jablonski P, Howden B, Marshall V y Scott D: Evaluation of citrate solution using the isolated perfused rat kidney. *Transplantation*, 30:239-243, 1980.
15. Cloyd CJ, Snyder BD, Cleeremans B y Bundle SR: Mannitol pharmacokinetics and serum osmolality in dogs and humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 236:301-306, 1986.
16. Warren SE y Blantz R: Mannitol. *Arch Intern Med*, 141:493-497, 1981.
17. Franklin WA, Ganote CE y Jennings RB: Blood flow after renal ischemia. Effects of hypertonic mannitol on reflow and tubular after-transient ischemia in the rat. *Arch Pathol*, 98:106-111, 1974.
18. Wilson DR, Thiel S y Arcoe ML: Glycerol induced hemoglobinuric acute renal failure in the rat. III. Micropuncture study of the effects of mannitol and isotonic saline on individual nephron function. *Nephron*, 4:337-355, 1967.
19. Weimar W, Geerlings W, Bijnen AB, Obertop H, Van Urk H, Lameijer LDF, Wolff ED y Jeekel J: A controlled study on the effect of mannitol on immediate renal function after cadaver donor kidney transplantation. *Transplantation*, 35:99-101, 1983.
20. Richards KF, Belnap LP, Rees WV y Stevens LE: Mannitol reduces ATN in cadaveric allografts. *Transplant Proc*, XXI:1228-1229, 1989.
21. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC y Tange J: An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation*, 35:198-204, 1983.
22. Bilde T, Dahlager JI, Asnaes S y Jaglicic D: The influence of warm ischemia on renal function and pathology. *Scand J Urol Nephrol*, 11:165-172, 1977.
23. Wusteman MC: The effect of warm ischemia on the function of rabbit kidneys measured by isolated normothermic perfusion. *J Surg Res*, 23:332-338, 1977.
24. Vogt MT y Farber E: On the molecular pathology of ischemic renal cell death. Reversible and irreversible cellular and mitochondrial metabolic alterations. *Am J Pathol*, 53:1-24, 1968.
25. Glaumann B y Trump BF: Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury: III. Morphological changes of the proximal pars recta tu-

- bules P3 of rat kidney made ischemic in vivo. *Virchows Arch Cell Pathol*, 19:303-323, 1975.
26. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF y Levinski NG: Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S1, S2 and S3 segments. *Kidney Int*, 14:31-49, 1978.
 27. Donohoe JF, Venkatachalam MA, Bernard DB y Levinski NG: Tubular leakage and obstruction after renal ischaemia: structural-functional correlations. *Kidney Int*, 13:208-222, 1978.
 28. Alcom D, Emslie KR, Ross BD, Ryan GB y Tange JD: Selective distal nephron damage during isolated kidney perfusion. *Kidney Int*, 19:638-647, 1981.
 29. Beltzer FO y Southard JH: Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation*, 43:673-676, 1988.
 30. Andrews PM y Colley AK: Protection of kidneys from acute renal failure resulting from normothermic ischemia. *Lab Invest*, 49:87-98, 1983.
 31. Blanz RC: Effect of mannitol on glomerular ultrafiltration in the hydropenic rat. *J Clin Invest*, 54:1135-1143, 1974.
 32. Lilién C: The paradoxical reaction of renal vasculature to mannitol. *Invest Urol*, 10:346-353, 1973.
 33. Flores J, Di Bona DR y Beck CH: The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J Clin Invest*, 51:118-126, 1972.
 34. Johnson PA, Bernard DB, Perring NS y Levinski NG: Prostaglandins mediate the vasodilatory effect of mannitol in the hypoperfused rat kidney. *J Clin Invest*, 65:127-133, 1981.
 35. Southard JH, Marsh DC, McAnulty JF y Beltzer FO: Oxygen derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery*, 101:566-560, 1987.
 36. Winchell RJ y Halasz NA: Lack of effect of oxygen radical scavenging systems in the preserved reperfused rabbit kidney. *Transplantation*, 48:393-396, 1989.